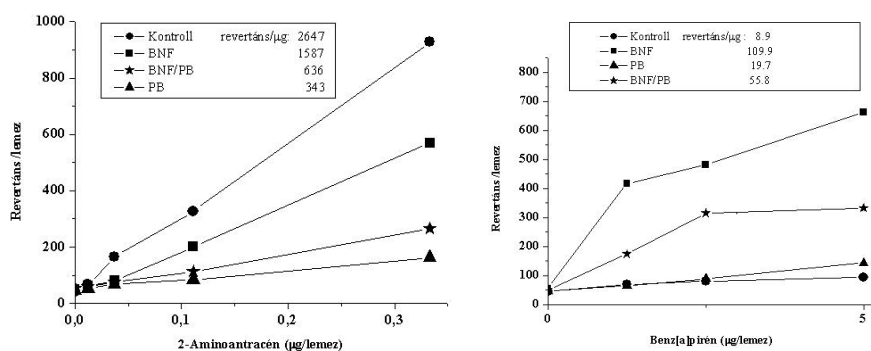


Az Ames teszt (Salmonella/S9) a nemzetközi hatóságok által a kémiai anyagok minősítéséhez előírt vizsgálat, amellyel az esetleges genotoxikus hatás kockázatát mérik fel. Annak érdekében, hogy az anyavegyületével együtt a belőle keletkező metabolitok mutagén hatása is kimutatható legyen, a tesztben metabolikus aktiváló rendszert használnak, ami rutinszerűen β -naftoflavon (BNF) és fenobarbitál (BP) kombinációjával (BNF+PB) kezelt patkányok májából izolált S9 frakció, kiegészítve a citokróm P450 (CYP) enzimek működését biztosító NADPH generáló rendszerrel. Ebben a formában a teszt csak a fázis I enzimek (elsősorban CYP izoenzimek) katalizálta reakciókban képződő metabolitok mutagén sajátosságát jelzi, és figyelmen kívül hagyja az emlős sejtekben lezajló konjugációs- (fázis II reakciók) és transzportfolyamatokat (fázis III), melyek szintén elősegíthetik, vagy éppen meggátolhatják a mutagén hatás kialakulását. Sok esetben a teszt téves pozitív vagy téves negatív eredményt ad a fentiek miatt. További nehézséget jelent a patkányból származó metabolikus aktiváló rendszerrel kapott eredményeken alapuló extrapolálás, a humán kockázatbecslés, hiszen az enzimaktivitás, a szubsztrátspecifitás és a reguláció tekintetében a fajok között komoly különbségek lehetnek. Ebből kiindulva, munkánk során az Ames tesztben metabolikus aktiváló rendszerként általánosan alkalmazott patkány máj S9 frakció humán máj S9 frakcióval, illetve patkány és humán májsejtekkel történő helyettesítésének lehetőségét tanulmányoztuk.

Két modell vegyület vizsgálata alapján először arra a kérdésre kerestünk választ, hogy indokolt-e a BNF+PB kettős indukcióval nyert patkány máj S9 frakció alkalmazása metabolikus aktiváló rendszerként az Ames tesztben. A két kiválasztott modellvegyület a benz(a)pirén (BP) és 2-aminoantracén (AA) volt. Irodalmi adatok alapján a BP aktiválását nagyrészt a CYP1A1, míg a 2AA aktiválását a CYP1A2 enzimek végzik. A kísérletek során hím Wistar patkányokat kezeltünk PB-lal, BNF-nal és BNF+PB-lal. Az Ames tesztet vagy az azonos kezelési csoportba tartozó állatok májából készült egyesített S9 frakciók, vagy a májából izolált primer hepatociták felhasználásával, előinkubálást alkalmazó módszerrel végeztük el. Etoxirezorufin-O-dealkiláz (EROD, CYP1A) és pentoxirezorufin-O-dealkiláz (PROD, CYP2B) aktivitás mérésével ellenőriztük az enzimindukció mértékét. BNF hatására az EROD aktivitás a 29-szeresére, míg BNF+PB kezelés esetén a 22-szeresére nőtt. A PB és a BNF+PB kezelés közel azonos mértékben kb. 40-szeresre növelte a PROD aktivitást.

A BP esetében a BNF kezelés összhangban az EROD aktivitás megemelésével nagymértékű mutagén potenciál növekedést okozott, ezzel ellentétben a PB kezelés és a kettős indukció aktiváló hatása kisebb volt. A 2AA esetében a mutagén vegyület koncentrációjától nagymértékben függött, hogy az induktorok milyen hatást fejtettek ki. Kis koncentrációban leghatékonyabban a kezeletlen állat S9 frakciója aktiválta a 2AA-t. A PB kezelés és a kettős indukció azonban erősen lecsökkentette a mutagén potenciált, ami arra utal, hogy az alkalmazott körülmények között nem a CYP1A aktivitás határozza meg elsősorban a mutagenitást. Kísérleteink eredménye azt bizonyítja, hogy a BNF+PB kettős indukció alkalmazása nem minden promutagén esetében előnyös, hiszen mindkét vizsgált vegyületnél rontotta a mutagén hatás detektálhatóságát.



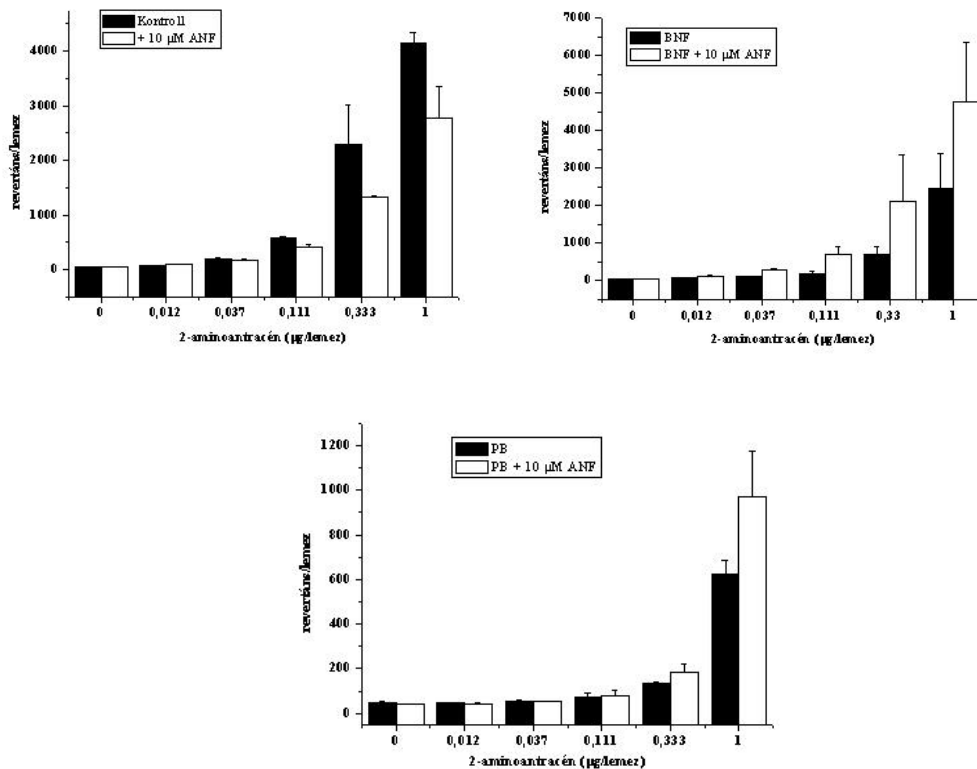
A következő lépésben a primer hepatociták alkalmazásának lehetőségét vizsgáltuk az Ames tesztben. 3-Metilkolantrénnel (MC) és BNF-nal kezelt állatokból izoláltuk a primer hepatocitákat, és az S9 frakció helyett a sejtszuspenziót használtuk metabolikus aktiváló rendszerként, ugyancsak előinkubálásos módszerrel. A BNF és a MC kezelés is jelentősen megnövelte a mutagén potenciált a BP esetében. Hepatocitákat alkalmazva metabolikus aktivátorként az S9 frakcióval kapott adatokkal ellentétben a BNF jelentősen megnövelte a 2AA mutagenitását összhangban azzal az irodalmi ismerettel, hogy a CYP1A2 szerepet játszik az aromás amin aktiválásában.

Ahhoz, hogy közvetlen humán kockázatbecslésre is alkalmazható legyen a rendszer az szükséges, hogy primer hepatocita kultúrából izolált sejtek is képesek legyenek a promutagén vegyületek aktiválására. Sokan leírták ugyanis, hogy a primer kultúrában tartott hepatociták elveszítik CYP aktivitásuk egy részét. Bizonyos izoenzimek indukálhatóak ugyan, de meg kellett vizsgálni, hogy a 72 órás indukció idejére kultúrában tartott sejtek elég metabolitot képeznek-e a promutagén vegyületekből ahhoz, hogy mutagenitásuk az Ames tesztben detektálható legyen. Kísérleteink során a

72 órás kezeletlen primer hepatocita kultúrából izolált sejtek a kezeletlen patkányból izolált májsejtek EROD aktivitásának csak 15 %-át tartották meg. *In vitro* MC kezelés eredményeképpen az EROD aktivitás a kontroll 200-szorosára nőtt, ami az *in vivo* indukált patkányokból izolált sejtek EROD aktivitásának csak 28 %-a. Ennek ellenére a BP esetében az *in vitro* MC indukció hatására a mutagén potenciál tízszeresre nőtt, ami megfelel az *in vivo* indukált sejtekkel elért mutagenitás 47 %-ának. A 2AA mutagenitását tekintve, az *in vitro* MC indukció nyomán a sejtek visszanyerték az *in vivo* indukált sejtek aktiváló képességének 68 %-át. Az eredmények egyrészt azt tükrözik, hogy patkány hepatocitákat alkalmazva metabolikus aktivátorként az Ames teszt jól működik, másrészt, hogy az *in vitro* sejt kultúrában indukált sejtek is alkalmasak metabolikus aktivátornak a teszthez, ami lehetővé teheti *in vitro* indukált humán hepatociták használatát is. Májsejtek alkalmazása a promutagének metabolikus aktiválására elősegítheti a hatékony enzim induktorok azonosítását, és módot ad a vegyületek aktiválásában részt vevő összes lényeges enzim szerepének tisztázására. (A fenti eredményeket a Mutagenesis (vol. 19, pp. 245-250) című folyóiratban közzétettük 2004-ben.)

Az irodalomban elfogadott nézet szerint a 2AA metabolikus aktiválását elsősorban a CYP1A családba tartozó enzimek végzik. Ez az állítás azonban szinte kizárólag expresszált CYP enzimek vizsgálatán alapul. Mivel kísérleteink során a 2AA mutagenitását a BNF-nal végzett indukció (CYP1A indukció) a várakozással ellentétben nem növelte, hanem csökkentette az S9 frakcióval végzett metabolikus aktiváció során, a továbbiakban CYP enzim gátlók alkalmazásával megvizsgáltuk, hogy a CYP enzimek milyen szerepet játszanak az aromás amin aktiválásában.

Az alfa-naftoflavon (ANF), amely specifikus CYP1A enzim gátló, csökkentette a 2AA metabolikus aktiválását kezeletlen állatokból származó S9 frakció jelenlétében. A BNF-nal, kezelt állatokból nyert S9 esetében azonban az ANF meglepő módon nem csökkentette, hanem jelentősen növelte a metabolikus aktivációt. Ez ellentmond annak a feltételezésnek, hogy a CYP1A2 enzim döntő szerepet játszik a BNF-nal kezelt állatból nyert S9 frakció esetében is a 2AA aktiválásában, alátámasztva korábbi kísérleteink eredményeit.



Az irodalomban leírtak alapján az ANF képes a CYP3A4 enzimet aktiválni, ezért az ANF mellé klotrimazolt (CL), egy ismert CYP3A gátlót is juttattunk az előinkubációs elegybe. A 2AA ANF hatására megnövekedett mutagenitását a CL nem csökkentette, ami arra utal, hogy a mutagenitás megnövekedése ANF hatására nem a CYP3A aktivációjának következménye. A következő lépésben egy általános CYP gátló, a benzimidazol (BI) alkalmazásával arra kerestünk választ, hogy a 2AA metabolikus aktiválásához milyen mértékben járulnak hozzá a CYP enzimek a BNF-al kezelt állatokból nyert S9 frakció jelenlétében. A BI is jelentősen megnövelte a 2AA mutagenitását, ami arra utal, hogy az aktiválásban a CYP enzimeknek nem lehet döntő szerepük. A mutagenitás növekedéséért valószínűleg a 2AA detoxikálási reakcióinak gátlása felelős.

A fenti eredményekkel ellentétben, amennyiben az Ames tesztben a széles körben elterjedt és általánosan alkalmazott S9 frakció helyett hepatocitákat alkalmaztunk metabolikus aktiváló rendszerként, akkor a BNF kezelés megnövelte, az ANF pedig csökkentette a 2AA mutagenitását. Ez arra utal, hogy a két metabolikus rendszerben, az S9 frakcióban és a hepatocitákban különböző enzimek játszanak szerepet a 2AA

metabolizmusában. Eredményeink rámutatnak arra, hogy a kockázatbecslés kimenetele erősen függhet az alkalmazott aktivációs rendszertől. (Ezen eredményeinket a *Mutation Research* (vol. 586, pp. 18-27) című folyóiratban közzétük 2005-ben.)

A fajok közötti, a metabolikus aktivációban meglévő esetleges különbségek vizsgálata céljából a 2AA mutagenitását 7 különböző humán májmintából készített S9 frakcióval is tanulmányoztuk. Ezen vizsgálatokba egy újabb aromás amin, a 2-amino-fluorént (2AF) is bevontuk. Munkánk során tisztázni szeretnénk volna a CYP enzimeknek és néhány UDP-glükuronil-transzferáznak (UGT) a metabolikus aktivációban játszott szerepét is. Ennek érdekében CYP gátlókat és az UGT enzimek kofaktorát az UDP-glükuronsavat (UDPGA) is felhasználtuk a kísérletek során. A humán S9 frakciók mennyiségét úgy állítottuk be, hogy az S9 mixek fehérjetartalma azonos legyen és megegyezzen a patkány S9 mix fehérjetartalmával. Mind a 7 humán S9 preparátum képes volt az aromás aminos aktiválására, de az aktivációs készség szélsőértékei között a 2AA esetén kb. 8-szoros, míg a 2AF esetén kb. 20-szoros különbséget találtunk. A 2AA minden egyes humán S9 frakció jelenlétében lényegesen erősebb mutagénné bizonyult, mint a 2AF.

A CYP enzim gátlók közül az ANF (10 μ M) a különböző donoroknál változó mértékben kb. 50-90 % közötti gátlást okozott a 2AA mutagén potenciál értékében, míg a 2AF mutagén potenciálját az összes donor esetében több mint 90 %-ban gátolta, ami a CYP1A izoenzimek szerepének fontosságára utal az aromás aminos metabolikus aktiválásában.

A nem specifikus CYP enzim gátló, a BI (1 mM) az ANF-hoz hasonlóan a donoroktól függően kb. 50-80 %-ban csökkentette a 2AA mutagenitását, viszont ennél lényegesen nagyobb mértékű mutagén potenciál csökkenést idézett elő a 2AF-nél. Ez az eredmény összhangban az ANF hatását számszerűsítő adatokkal igazolja a CYP enzimek jelentőségét a két aromás aminos aktiválásában. E kérdés további elemzéséhez nyolc CYP enzimnek az egyedi májmintákban mérhető aktivitása és a májmintákból készített S9 frakciók metabolikus aktiváló hatása között kerestük az esetleges összefüggést mindkét aromás aminra vonatkozóan. Az egyes izoenzimek specifikus aktivitás értékeinek meghatározásához a következő reakciókat használtuk: fenacetin-O-dealkiláció és etoxi-rezorufin-O-deetiláció (CYP1A2); kumarin hidroxiláció (CYP2A6); pentoxi-rezorufin-O-dealkiláció (CYP2B6); tolbutamid-hidroxiláció (CYP2C9); S-mefenitoin-4'-

hidroxiláció (CYP2C19); dextrometorfán-O-demetiláció (CYP2D6); klorzoxazon-6-hidroxiláció (CYP2E1) és tesztoszteron-6- β -hidroxiláció (CYP3A4). Az ANF okozta mutagén potenciál csökkenéssel összhangban a CYP1A aktivitás és a mutagenitás között mindkét vegyületnél jól kimutatható volt az összefüggés. A korreláció analízis a 7 donorból származó minták alapján $r^2 = 0,5$ értéket eredményezett a 2AA esetében, és jelentősen nagyobb $r^2 = 0,8$ értéket mutatott a 2AF esetében, ami alátámasztja, hogy a CYP1A enzimek szerepet játszanak a két amin humán májban történő aktiválásában, bár részvételük aránya e vegyületek metabolizmusában eltérő mértékű. A 2AA-nél kapott gyengébb korreláció arra utal, hogy a vegyület mutagén tulajdonságának kialakításában más enzimek is lényegesek, ahogy azt a patkány S9 frakciók esetén is kimutattuk. A vizsgált CYP enzimek közül a CYP2E1 izoenzimmel ugyan szintén kaptunk egy kisebb mértékű korrelációt, amit viszont nem támasztották alá az enzim gátlószerével (dietil-ditio-karbamát) végzett vizsgálatok.

Ismeretes, hogy az aromás aminok metabolikus aktiválásában a fázis I reakciók mellett bizonyos fázis II reakcióknak (acetil és szulfát konjugáció) is lényeges szerepük van. Kevesebb adat áll azonban rendelkezésre a mutagenitást csökkentő folyamatokról. Ezért bővítettük ki vizsgálatainkat az UGT enzimek mutagén potenciált befolyásoló hatásának tanulmányozásával. Az Ames tesztben rutinszerűen alkalmazott S9 mix kiegészítése az UGT enzimek kofaktorával (UDPGA) lehetővé teszi ezen konjugáló enzimek részvételének felderítését a mutagén vegyületek metabolikus aktiválásában. Az UDPGA hozzáadása az előinkubációs elegyhez a 2AA és a 2AF esetében is lecsökkentette a képződött revertánsok számát minden egyes humán S9 jelenlétében. Hasonlóan a CYP enzimekkel végzett korrelációs analízishez, a humán májminták UGT aktivitását is megpróbáltunk összefüggésbe hozni a 2AA és 2AF mutagenitásának UDPGA hatására bekövetkező változásával. A következő konjugációs reakciókat vizsgáltuk: bilirubin-glükuronidáció (UGT1A1); para-nitro-fenol-glükuronidáció (UGT1A6, UGT1A9) és 2,6-diizopropil-fenol-glükuronidáció (UGT1A9). A kapott eredmények alapján a 2AA esetében nem a három vizsgált UGT izoenzim játszhat szerepet a vegyület metabolizmusában, mert nem találtunk korrelációt a májminták enzimaktivitása és mutagén aktiváló tulajdonsága között, de az is elképzelhető, hogy részt vesznek ugyan a metabolizmusban, de kiemelt szerepük nincs. Ezzel ellentétben a 7 humán S9 frakció 2AF aktiváló képessége és UGT1A1, valamint UGT1A9 specifikus aktivitása között

jelentős korreláció mutatkozott, ($r^2 = 0,8$) ami arra utal, hogy ezek a konjugációs enzimek hozzájárulnak az aromás amin, illetve a belőle keletkező mutagén metabolitok eltávolításában.

Miután a humán májminták segítségével az *in vivo* enzim indukció nem vizsgálható, ezért lényeges a humán hepatociták primer kultúrájának létrehozása, ami lehetőséget teremt az *in vitro* indukció tanulmányozására, és így a kérdéses vegyületek metabolizmusában lényeges szerepet játszó enzimek azonosítására is. A három napon át BNF-nal indukált humán májsejt kultúrából készített S9 frakció kb. 40-szer nagyobb mutagén potenciál növekedést okozott a 2AA esetében, mint a kontroll sejtekből nyert S9 frakció. A CYP1A enzim gátló ANF (10 μ M) pedig közel 100%-kal csökkentette a 2AA mutagenitását, ami egyrészt a CYP1A enzimek aktiváló szerepét támasztja alá, másrészt rámutat a fajok közötti különbségre is, hiszen a BNF-nal kezelt patkányokból izolált S9 frakció jelenlétében az ANF nemhogy csökkentette volna a 2AA mutagenitását, de jelentősen megnövelte azt. Ez az eredmény felhívja a figyelmet arra, hogy bizonyos mutagének esetében a patkányból származó metabolikus aktiváló rendszer használata helytelen következtetésekre vezethet. A humán májmintákkal végzett kísérletek eredményeit a közeljövőben szeretnénk publikálni.

Az eredményeket összefoglalva a következő megállapításokat tehetjük:

- A BNF+PB kettős indukció rutinszerű alkalmazása félrevezető lehet, hiszen mindkét általunk vizsgált mutagén esetében rontotta a mutagén potenciál kimutathatóságát.
- A jelentős fajok közötti különbségek miatt a patkányról emberre történő extrapoláció nem megbízható.
- A kockázatbecslésnél az *in vivo* működő detoxikációs (főleg fázis II reakciók) folyamatokat nem lehet figyelmen kívül hagyni.